

## FR2823220

### Publication Title:

Novel polypeptide encoded by nucleotide sequence derived from human erythropoietin gene with single nucleotide polymorphisms, for diagnosing, preventing and treating cancers, infections and autoimmune diseases

### Abstract:

#### Abstract of FR 2823220

(A1) An isolated polypeptide (I) comprising all or part of a 193 residue amino acid sequence (S1), given in the specification, and having at least one coding single nucleotide polymorphism (SNP) chosen from D70N, G104S and S147C, is new. Independent claims are also included for the following: (1) an isolated polynucleotide (II) comprising all or part of a human wild-type erythropoietin (EPO) nucleotide sequence (S2) comprising 3398 base pairs, given in the specification, provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP chosen from 465-486 (deletion), c577t, g602c, c1288t, c1347t, g1644a, g2228a, g2357a, c2502t, c2621g, g2634a or its complement; (2) an isolated polynucleotide encoding (I); (3) genotyping (M1) all or part of a polynucleotide having 80-100 % identity with S2, by amplifying a region of interest in the genomic DNA of a subject or a population of subjects and determining the allele of at least one of the SNP positions as above in S2; (4) a recombinant vector (III) comprising (II); (5) a host cell (IV) comprising (III); (6) separating (I); (7) a polypeptide encoded by (II); (8) a hyperglycosylated analog (V) of the polypeptide comprising amino acids 28-193 of S1 and having SNP G104S; (9) an immunospecific antibody (VI) resulting obtained by immunizing an animal with polypeptide encoded by (II); (10) a therapeutic agent (VII) comprising one or more compounds chosen from (I)-(VI); (11) determining statistically relevant associations between at least one SNP in the EPO gene, and a disease or resistance to disease; (12) diagnosing or determining a prognosis of a disease or a resistance to a disease, by detecting at least one SNP in the EPO gene; (13) identifying a compound among one or more compounds to be tested having a biological activity substantially similar to or higher than the activity of G104S mutated EPO gene product; (14) a compound (VIII) identified by the method of (13); (15) molecules (IX) characterized by helices A, B, C and D having cellular proliferative functional characteristics at least equal to that of wild-type human EPO and capable of binding to an EPO receptor, having at least one alteration in the amino acid sequence of the helix B thus resulting in binding of EPO receptor with higher affinity than that of wild-type human EPO; (16) improving the cellular proliferative functionality of an EPO-like molecule having a portion corresponding to the helix B portion of wild-type EPO and capable of binding to EPO receptor; (17) a therapeutic compound comprising (IX); (18) improving the functionality of human wild-type EPO molecule having helices A, B, C and D; and (19) a compound (X) produced by the method of (18).

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 823 220**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②① N° d'enregistrement national : **01 04603**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : **C 12 N 15/12**, C 12 Q 1/68, C 12 N 15/63, C 12 P 21/  
02, 21/08, C 07 K 14/505, 16/22, G 01 N 33/68, A 61 K 38/18,  
48/00, 39/395, A 61 P 7/00, 9/00, 19/00, 35/00, 17/00, 25/00

①⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②② Date de dépôt : 04.04.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 11.10.02 Bulletin 02/41.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *GENODYSSEE Société anonyme —  
FR.*

⑦② Inventeur(s) : *ESCARY JEAN LOUIS.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : *RINUY SANTARELLI.*

⑤④ **NOUVEAUX POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES DE L'ERYTHROPOIETINE (EPO).**

⑤⑦ Polynucléotide isolé comprenant:  
a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 %  
d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence co-  
dante, sous réserve que cette séquence nucléotidique com-  
porte au moins l'un des polymorphismes de type SNP  
suivants:  
- g1644a,  
- g2357a,  
- c2621g, ou  
b) une séquence nucléotidique complémentaire à une  
séquence nucléotidique sous a).

FR 2 823 220 - A1



5                   La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comportant des polymorphismes de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène érythropoïétine (EPO) ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.

10   ART ANTERIEUR

                  Le gène humain codant pour l'érythropoïétine (EPO) est décrit dans la publication de Jacobs, K. et al., "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin"; Nature 313 (6005), 806-810 (1985).

15                  La séquence nucléotidique de ce gène est accessible sous le numéro d'accès X02158 dans la base de données GenBank.

                  Cette protéine est connue pour agir sur la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules souches de l'érythropoïèse en érythrocytes.

20                  L'EPO est également connue pour agir en tant que facteur autocrine dans certaines cellules érythroleucémiques et pour être un facteur mitogène et un chémo-attractant pour les cellules endothéliales.

                  L'EPO est aussi connue pour stimuler les lymphocytes B activés et augmenter leurs productions en immunoglobulines.

25                  L'expression de l'EPO est sous le contrôle d'un mécanisme complexe qui se situe aux niveaux des reins et de la moelle osseuse.

                  La synthèse de la protéine EPO dépend de la pression veineuse en oxygène et est stimulée dans des conditions d'hypoxie. La production d'EPO est par ailleurs influencée par des facteurs hormonaux, tels la testostérone, les hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance et les catécholamines. En  
30 hormones thyroïdiennes, l'hormone de croissance et les catécholamines. En revanche, certaines cytokines telles les interleukines IL-1 et IL-6, et le TNF-alpha régulent négativement la synthèse d'EPO.

La liaison de l'EPO sur son récepteur induit, dans la cellule :

- un relargage de phospholipides membranaires,
  - la synthèse de diacyl glycérol,
  - l'augmentation du taux intracellulaire en calcium,
  - 5 - l'augmentation du pH intracellulaire, et
  - l'augmentation du taux intracellulaire de la phospholipase C qui
- elle-même induit les oncogènes fos et myc.

Il est connu que l'excès d'EPO conduit à la lyse des érythrocytes, qui s'accompagne d'une augmentation de la viscosité sanguine favorisant ainsi  
10 des complications cardiaques et l'hypertension pulmonaire. On observe également une diminution des taux de plaquettes sanguines.

Un autre effet secondaire important d'un excès d'EPO sont les thromboses.

L'embolie pulmonaire ou cérébrale, c'est à dire l'oblitération  
15 (blocage) brusque d'un vaisseau sanguin par un caillot ou un corps étranger véhiculé par le sang, est aussi un autre sérieux problème relié à la consommation de cette protéine.

En revanche, dans les cas où l'EPO n'est pas synthétisée en quantités suffisantes, comme dans certaines maladies rénales chroniques, on  
20 observe fréquemment l'installation d'anémies.

Ainsi, l'EPO est souvent administrée aux patients atteints d'insuffisances rénales chroniques, avec des hématocrites inférieurs à 0,3, en particulier chez des patients placés sous dialyse.

La complication majeure des traitements par l'EPO reste  
25 l'hypertonie, l'augmentation des taux d'urée, de potassium et de phosphates, une viscosité sanguine accrue et une augmentation du nombre de cellules progénitrices de la voie des plaquettes avec pour conséquence une élévation du nombre de plaquettes sanguines circulantes.

L'EPO est également utilisée comme stimulant de l'hématopoïèse,  
30 en particulier pour favoriser des transfusions sanguines autologues.

Par ailleurs, il a été suggéré que l'EPO puisse être utilisée pour limiter les anémies consécutives à des infections chroniques, des processus inflammatoires, des radiothérapies et des chimiothérapies.

Dans une certaine mesure l'EPO est un stimulateur de la  
5 différenciation des mégacaryocytes. Cet effet est potentialisé par l'interleukine IL-4.

Il semblerait que l'EPO possède également des capacités neuroprotectrice puisqu'il a été montré que l'EPO protège *in vivo* les neurones contre la mort cellulaire induite par des ischémies, probablement en limitant la  
10 production de radicaux libres et en limitant les effets du stress oxydatif.

La demanderesse a trouvé de nouveaux polypeptides et nouveaux polynucléotides analogues à l'EPO, ayant une fonctionnalité différente de l'EPO naturel, pouvant être utilisés notamment pour traiter ou prévenir les dérèglements ou maladies mentionnés précédemment et éviter tout ou partie  
15 des inconvénients qui leurs sont liés.

### L'INVENTION

L'invention a pour principal objet de nouveaux polynucléotides qui diffèrent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'EPO,  
20 en ce qu'ils comportent un ou plusieurs polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) fonctionnels.

Le gène de l'EPO humain sauvage est représenté par la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 qui comporte 3398 nucléotides.

La séquence nucléotidique codante de la protéine immature  
25 commence au nucléotide 615 (codon start) et finit au nucléotide 2763 (codon stop), dans la séquence nucléotidique du gène EPO humain sauvage de référence.

Ce gène comporte 5 exons qui sont positionnés de la façon suivante sur la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 :

30 Exon 1 : du nucléotide 397 au nucléotide 627 (comprend le codon d'initiation au nucléotide 615).

Exon 2 : du nucléotide 1194 au nucléotide 1339.

Exon 3 : du nucléotide 1596 au nucléotide 1682.

Exon 4 : du nucléotide 2294 au nucléotide 2473.

Exon 5 : du nucléotide 2608 au nucléotide 3327 (comprend le codon stop se terminant au nucléotide 2763).

5                    La demanderesse a découvert 3 polymorphismes de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence de l'EPO.

Ces 3 polymorphismes de type SNP fonctionnels sont présentés ci-dessous :

10                    1) Le nucléotide guanine (g) en position 1644 de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence EPO est muté en adénine (a).

Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après g1644a.

15                    2) Le nucléotide guanine (g) en position 2357 de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence EPO est muté en en adénine (a).

Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après g2357a.

20                    3) Le nucléotide cytosine (c) en position 2621 de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence EPO est muté en en guanine (g).

Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après c2621g.

25                    Ces polymorphismes de type SNP fonctionnel ont été identifiés par la demanderesse au moyen du procédé de détermination décrit dans sa demande de brevet FR 00 22894, intitulée "Procédé de détermination d'un ou plusieurs polymorphisme(s) fonctionnel(s) dans la séquence nucléotidique d'un gène "candidat" fonctionnel présélectionné et ses applications" et déposée le 6 décembre 2000, citée ici à titre de référence.

30                    Le procédé décrit dans cette demande de brevet permet l'identification d'un (ou plusieurs) polymorphisme(s) de type SNP fonctionnel(s) préexistant(s) dans au moins un individu constitutif d'une population aléatoire d'individus.

Dans le cadre de la présente invention, un fragment de la

séquence nucléotidique du gène EPO, comprenant la séquence codante, a été isolé chez des individus dans une population d'individus choisis de manière aléatoire.

Un séquençage de ces fragments a ensuite été réalisé sur  
5 certains de ces échantillons présentant un profil hétéroduplex (différent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'EPO) après analyse par DHPLC.

On a alors comparé le fragment ainsi séquencé à la séquence nucléotidique du fragment du gène EPO sauvage de référence et identifier les  
10 trois polymorphismes de type SNP, objets de la présente invention.

Ainsi les polymorphismes de type SNP fonctionnels conformes à l'invention sont naturels et sont présents chez certains individus de la population mondiale.

Le gène EPO sauvage de référence code pour une protéine  
15 immature de 193 acides aminés qui sera convertit en protéine mature de 166 acides aminés, par section du peptide signal qui comprend les 27 premiers acides aminés.

La structure de l'EPO naturel comprend quatre hélices appelées A, B, C, et D.

20 Chacun des polymorphismes de type SNP de l'invention g1644a, g2357a et c2621g entraînent des modifications de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène EPO, au niveau de la séquence d'acides aminés.

Ces modifications dans la d'acides aminés sont les suivantes :

25 1) Le polymorphisme de type SNP g1644a entraîne une mutation de l'acide aminé acide aspartique (D) en position 70 dans la protéine immature du gène EPO, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en asparagine (N) et en position 43 de la protéine mature.

Dans la description de la présente invention, on appellera  
30 indifféremment D43N et D70N la mutation codée par le polymorphisme de type SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

2) Le polymorphisme de type SNP g2357a entraîne une mutation de l'acide aminé glycine (G) en position 104 dans la protéine immature du gène EPO, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en sérine (S) et en position 77 de la protéine mature.

5 Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment G77S et G104S la mutation codée par le polymorphisme de type SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

3) Le polymorphisme de type SNP c2621g entraîne une mutation  
10 de l'acide aminé sérine (S) en position 147 dans la protéine immature du gène EPO, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en cystéine (C) et en position 120 de la protéine mature.

Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment S120C et S147C la mutation codée par le polymorphisme de  
15 type SNP de l'invention selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

Les polymorphismes de type SNP de l'invention entraînent des modifications de la conformation spatiale des polypeptides conformes à l'invention par rapport au polypeptide codé par la séquence nucléotidique du  
20 gène sauvage de référence EPO.

Ces modifications peuvent être observées par modélisation moléculaire bio-informatique, selon des méthodes bien connues de l'homme du métier mettant en œuvre, par exemple, les outils de modélisation *de novo* (par exemple, SEQFOLD/MSI), d'homologie (par exemple, MODELER/MSI), de  
25 minimisation des champs de force (par exemple, DISCOVER, DELPHI/MSI) et/ou de dynamique moléculaire (par exemple, CFF/MSI).

Des exemples de telles modélisations sont donnés ci-après dans la partie expérimentale.

1) La modélisation bio-informatique permet d'observer que la  
30 mutation D43N sur la protéine mutée mature entraîne une modification structurale au niveau de la boucle située entre les hélices A et B de l'EPO naturel, ainsi qu'une variation de structure de la longue boucle reliant les



hélices C et D de l'EPO naturel dans la zone P129-I133 faisant face à l'acide amine muté N43.

Cette mutation, proche de la courte hélice F48-R53, impliquée dans la liaison avec le récepteur de l'EPO, entraîne ainsi un effet sur  
5 l'interaction de l'EPO avec ce dernier.

Ainsi, la protéine mutée possède une conformation tridimensionnelle très différente de la protéine codée par le gène sauvage de l'EPO naturel.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la  
10 présence de l'asparagine en position 43 de la protéine mature entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de l'EPO naturel.

2) La modélisation bio-informatique permet d'observer que la mutation G77S sur la protéine mutée mature entraîne un dépliement total de la fin de l'hélice B, dû à un encombrement stérique avec le résidu phénylalanine  
15 138 situé sur l'hélice D, ainsi qu'à une interaction défavorable entre un acide aminé hydrophile (sérine 77) et un acide aminé hydrophobe (leucine 35) sur la boucle reliant les hélices A et B.

Ainsi, la protéine mutée possède une conformation tridimensionnelle très différente de la protéine codée par le gène sauvage de  
20 l'EPO naturel.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la présence de la sérine en position 77 entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de l'EPO naturel, notamment en altérant l'affinité de ce dernier pour son récepteur.

25 3) La modélisation bio-informatique permet d'observer que la mutation S120C sur la protéine mutée mature entraîne une modification structurale localisée au niveau de la boucle entre les hélices C et D, en particulier entre les acides aminés lysine 116 et alanine 125.

De plus, l'apparition d'une cystéine en position 120 doit aboutir à  
30 la formation de ponts disulfures additionnels dans la protéine de l'EPO mutée.

Ainsi, la protéine mutée possède une conformation tridimensionnelle très différente de la protéine codée par le gène sauvage de

l'EPO naturel.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la présence de la cystéine en position 120 entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de l'EPO naturel.

5 Un génotypage des polynucléotides conformes à l'invention peut également être effectué de façon à déterminer la fréquence allélique de ces polynucléotides dans une population. Un exemple de génotypage est donné, ci-après, pour le polymorphisme de type SNP c2621g, dans la partie expérimentale.

10 La détermination de la fonctionnalité des polypeptides de l'invention peut être mise en évidence par des tests dont les protocoles sont décrits dans les publications suivantes :

- Bittorf et al.; "Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3"; Cell Signal; 1994; Mar; 6(3) : 305-11.

15 - Chretien et al.; "Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation"; EMBO J.; 1996 Aug 15; 15(16) : 4174-81.

- Porteu et al.; "Functional regions of the mouse thrombopoietin receptor cytoplasmic domain : evidence for a critical region which is involved in differentiation and can be complemented by erythropoietin"; Mol. Cell. Biol.; 1996 May; 16(5) : 2473-82.

- Pallard et al.; "Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells"; EMBO J.; 1995 Jun 15; 14(12) : 2847-56.

25 L'invention a aussi pour objet la mise en évidence et l'utilisation de molécules thérapeutiques dérivant de polynucléotides et de polypeptides conformes à l'invention, notamment pour la prévention et le traitement des différents dérèglements et/ou maladies humaines.

Lesdites molécules thérapeutiques sont plus particulièrement  
30 utiles pour la prévention et le traitement de l'anémie, tout particulièrement chez les patients dialysés en insuffisance rénale, ainsi que l'anémie consécutive à

des infections chroniques, des processus inflammatoires, des radiothérapies, et des chimiothérapies.

Ces molécules thérapeutiques sont encore plus particulièrement utiles pour augmenter la production de sang autologue, notamment chez les patients participants à un programme de prélèvement autologue différé afin d'éviter une utilisation de sang homologue.

La Figure 1 représente la modélisation de la protéine codée conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP D70N et de la protéine EPO naturel.

La Figure 2 représente la modélisation moléculaire de la partie droite de chacune des protéines représentées sur la Figure 1.

Le ruban noir des Figures 1 et 2 représente la structure de la protéine EPO naturel.

Le ruban blanc des Figures 1 et 2 représente la structure de la protéine EPO mutée (D70N).

La Figure 3 représente la modélisation de la protéine codée conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP G104S et de la protéine EPO naturel.

La Figure 4 représente la modélisation moléculaire de la partie inférieure de chacune des protéines représentées sur la Figure 3.

Le ruban noir des Figures 3 et 4 représente la structure de la protéine EPO naturel.

Le ruban blanc des Figures 3 et 4 représente la structure de la protéine EPO mutée (G104S).

La Figure 5 représente la modélisation de la protéine codée conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP S147C et de la protéine EPO naturel.

La Figure 6 représente la modélisation moléculaire de la partie supérieure de chacune des protéines représentées sur la Figure 5.

Le ruban noir des Figures 5 et 6 représente la structure de la protéine EPO naturel.

Le ruban blanc des Figures 5 et 6 représente la structure de la protéine EPO mutée (S147C).

La Figure 7 représente le résultat du génotypage du polymorphisme de type SNP c2621g, dans une population d'individus.

5 Sur cette figure, les abscisses représentent la valeur mp du filtre Tamra (ddGTP) et les ordonnées représentent la valeur mp du filtre R-110 (ddCTP).

En haut à droite, le groupe hétérozygote CG contient 1 individu.

10 En haut à gauche, le groupe homozygote CC contient 235 individus.

En bas à gauche, le groupe d'individus contient 10 blancs et 13 individus non génotypés.

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

##### 15 Définitions

On entend par "séquence nucléotidique du gène sauvage de référence", la séquence nucléotidique du gène EPO humain accessible dans la GenBank sous le numéro d'accès X02158 et accessible dans la publication de Jacobs, K. et al.; "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of  
20 human erythropoietin"; Nature 313 (6005), 806-810 (1985).

On entend par "EPO naturel" le polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence. La protéine immature de l'EPO naturel correspond à la séquence peptidique ID SEQ N°2.

25 On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, par exemple, un ADN simple brin ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins, un ARN simple brin ou double brin et un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins. Le terme polynucléotide  
30 peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs régions triple brins. On entend également par polynucléotide les ADNs et ARNs

contenant une ou plusieurs bases modifiées de façon à avoir un squelette modifié pour la stabilité ou pour d'autres raisons. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine.

On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un  
5 oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée, comme dans le cas des peptides isostères, par exemple.

Un polypeptide peut être composé d'autres acides aminés que les  
20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut  
10 également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tel que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature. Ces modifications peuvent apparaître n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne  
15 d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-translation naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

20 On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente  
25 ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la  
30 sénéoloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telle que l'arginylation ou l'ubiquitination. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature :  
PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2<sup>nd</sup> Ed., T. E.

- Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 :626-646 et Rattan et al. "Protein
- 5 Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663 :48-62.

On entend par "polynucléotide isolé" ou "polypeptide isolé" un polynucléotide ou un polypeptide tel que défini précédemment qui est isolé du corps humain ou autrement produit par un procédé technique.

- 10 On entend par "identité", la mesure d'identité d'une séquence nucléotidique ou polypeptidique.

L'identité est un terme bien connu de l'homme du métier et de la littérature. Voir COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS

15 AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994; et SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987.

- Les méthodes communément employées pour déterminer
- 20 l'identité et la similarité entre deux séquences sont également bien décrites dans la littérature. Voir GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, et Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48 :1073.

- Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins
- 25 95 % avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 est un polynucléotide qui comporte au plus 5 points de mutation modifiés sur 100 nucléotides, par rapport à ladite séquence.

Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) nucléotide(s).

- 30 De même, un polypeptide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95 % avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 est un polypeptide

qui comporte au plus 5 points de mutation sur 100 acides aminés, par rapport à ladite séquence.

Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s).

Les polynucléotides et les polypeptides conformes à l'invention qui ne sont pas totalement identiques avec respectivement la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 ou la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, étant entendu que ces séquences comportent au moins un des polymorphismes de type SNP conformes à l'invention, sont considérés comme des variants de ces séquences.

Habituellement, un polynucléotide conforme à l'invention possède la même ou pratiquement la même activité biologique que la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 comportant au moins un des polymorphismes de type SNP conformes à l'invention.

De même, un polypeptide conforme à l'invention possède habituellement la même ou pratiquement la même activité biologique que la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 comportant au moins un des polymorphismes de type SNP conformes à l'invention.

Un variant, selon l'invention, peut être obtenu, par exemple, par mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On entend par "polymorphisme de type SNP", toute variation naturelle d'une base dans une séquence nucléotidique.

On entend par "polymorphisme de type SNP fonctionnel", un polymorphisme de type SNP qui a pour conséquence de modifier la fonctionnalité d'un polynucléotide ou d'un polypeptide codé par ce polynucléotide.

On entend par "fonctionnalité", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide codant pour ce polypeptide.

La fonctionnalité d'un polypeptide conforme à l'invention ou d'un polynucléotide codant pour ce polypeptide peut consister en une augmentation, une diminution ou une suppression de l'activité biologique, voire un

changement de nature de l'activité biologique soit du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence, soit de cette dernière séquence nucléotidique.

- L'activité biologique peut, notamment, être liée à l'affinité ou à  
5 l'absence d'affinité du polypeptide vis-à-vis d'un ligand, tel qu'un récepteur.

#### Polynucléotide

La présente invention a pour premier objet un polynucléotide isolé comprenant :

- 10 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité, préférentiellement au moins 90 % d'identité, plus préférentiellement au moins 95 % d'identité, et encore plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 615 au nucléotide 2763),  
15 sous réserve que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :  
- g1644a,  
- g2357a,  
- c2621g, ou  
20 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

La présente invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant :

- a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante sous  
25 réserve que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :  
- g1644a,  
- g2357a,  
- c2621g, ou  
30 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).



Préférentiellement, le polynucléotide de l'invention consiste en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, sous réserve que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 5    - g1644a,  
     - g2357a,  
     - c2621g.

     Selon l'invention, le polynucléotide défini précédemment comporte préférentiellement un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe  
10   constitué par :  
     - g1644a,  
     - g2357a, et  
     - c2621g.

     La présente invention a aussi pour objet un polynucléotide codant  
15   pour un polypeptide comprenant :  
     a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou  
     b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre  
     28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
     sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
20   comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :  
     - D70N,  
     - G104S,  
     - S147C.

     Selon un objet préféré de l'invention, le polypeptide défini  
25   précédemment comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :  
     - D70N,  
     - G104S, et  
     - S147C.

30       Préférentiellement le polynucléotide conforme à l'invention comprend une molécule d'ADN ou d'ARN.

Le polynucléotide de l'invention peut être obtenu par les méthodes standards de synthèse d'ADN ou d'ARN.

Ce polynucléotide peut également être obtenu par mutagenèse dirigée à partir de la séquence nucléotidique du gène EPO en modifiant l'un au moins des nucléotides g, g et c par respectivement les nucléotides a, a et g en position 1644, 2357 et 2621 sur la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

Les procédés de mutagenèse dirigée qui peuvent ainsi être mis en œuvre sont bien connus de l'homme du métier. On peut notamment évoquer la publication de TA Kunkel en 1985 dans "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488.

Le polynucléotide isolé peut également comprendre, par exemple, des séquences nucléotidiques codant pour des séquences d'acides aminés pre-, pro- ou pre-pro-protéine ou des séquences d'acides aminés marqueurs, comme l'hexa-histidine peptide.

Le polynucléotide de l'invention peut également être associé à des séquences nucléotidiques codant pour d'autres protéines ou fragments de protéines en vue d'obtenir des protéines de fusion ou à des fins de purification.

Le polynucléotide conforme à l'invention peut également comprendre des séquences nucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites, des séquences non-translatées, des séquences signal d'épissage, des séquences polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

On définit comme séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette séquence nucléotidique, dans des conditions stringentes.

On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes d'hybridation" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences nucléotidiques ont une identité d'au moins 80 %, de préférence supérieure ou égale à 90 %, encore plus préférentiellement supérieure ou égale à 95 % et tout particulièrement supérieure ou égale à 97 %.

Les conditions stringentes peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier et, par exemple, par une incubation des polynucléotides, à 42° C, dans une solution comprenant 50 % de formamide, 5xSSC (150 Mm de NaCl, 15 mM de trisodium citrate), 50 Mm de sodium phosphate (pH = 7,6), 5x Solution Denhardt, 10 % de dextran sulfate et  
5 20 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé, suivi d'un lavage des filtres à 0,1x SSC, à 65° C.

Dans le cadre de l'invention, lorsque les conditions stringentes d'hybridation permettent une hybridation des séquences nucléotidiques ayant  
10 une identité égale à 100 %, on considère que la séquence nucléotidique est strictement complémentaire à la séquence nucléotidique sous a), telle que décrite plus haut.

Il est bien entendu, au sens de la présente invention, que la séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique  
15 comportant l'un au moins des polymorphismes de type SNP conforme à l'invention doit comporter le même polymorphisme de type SNP en anti-sens.

Ainsi, par exemple, si la séquence nucléotidique comporte le polymorphisme de type SNP g1644a, sa séquence nucléotidique complémentaire comporte toujours le nucléotide t en position 1644.

20

Identification, hybridation et/ou amplification d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide défini précédemment, pour identifier, hybrider et/ou  
25 amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 615 au nucléotide 2763), sous réserve que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g1644a,
- 30 - g2357a,
- c2621g.

Génotypage et détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP

La présente invention a également pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide conforme à l'invention comme outil de génotypage.

- 5 La présente invention a aussi pour objet un procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide conforme à l'invention dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

- 10 Au sens de l'invention, on définit le génotypage comme un procédé de détermination du génotype d'un individu ou d'une population d'individus.

On entend par "population d'individus", un groupe d'individus déterminés de façon aléatoire ou non. Ces individus peuvent être des humains, des animaux ou des plantes.

- 15 Les individus peuvent être choisis selon leur ethnie ou selon leur phénotype, notamment ceux qui sont atteints par les dérèglements et/ou maladies suivantes : les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et  
20 des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie  
25 d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres  
30 gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention

est préférentiellement génotypé dans une population d'individus.

Il existe de multiples technologies de pouvant être mises en oeuvre pour génotyper des polymorphismes de type SNP génotypage (voir notamment Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, pp 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"). Ces technologies sont basées sur l'un des quatre principes suivants : hybridation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles, élongation d'un oligonucléotide par des didésoxynucléotides en présence ou non de désoxynucléotides, ligation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles ou clivage d'oligonucléotides spécifiques d'allèles. Chacune de ces technologies peut être couplé à un système de détection tel que la mesure de la fluorescence directe ou polarisée, ou la spectrométrie de masse.

Le génotypage peut être notamment effectué par un miniséquençage avec des ddNTPs chauds (2 ddNTPs différents marqués par des fluorophores différents) et froids (2 ddNTPs non marqués), en liaison avec un lecteur de fluorescence polarisé. Le protocole de miniséquençage avec lecture de fluorescence polarisée (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation) est bien connu de l'homme du métier.

Il peut être réalisé sur un produit obtenu après amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADN de chaque individu. Ce produit PCR est choisi pour couvrir la région génique du polynucléotide contenant le polymorphisme de type SNP étudié. Après la dernière étape dans le thermocycleur de la PCR, la plaque est alors placée sur un lecteur de fluorescence polarisée pour la lecture des bases marquées en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifique des fluorophores. Les valeurs d'intensité des bases marquées sont reportées sur un graphe.

Les amorces respectivement sens et antisens pour l'amplification PCR, dans le cas des polymorphismes de type SNP conformes à l'invention, peuvent être facilement choisis par l'homme du métier à partir de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 et de la position des polymorphismes de type SNP.

Par exemple, les séquences nucléotidiques ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4 peuvent être utilisées pour amplifier et obtenir une séquence

nucléotidique comprenant les polymorphismes de type SNP g2357a et/ou c2621g.

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier et d'isoler un fragment d'une longueur de 626 nucléotides, du nucléotide 2192 au nucléotide 2817. Ces positions de nucléotides font référence à la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

Une analyse statistique de la fréquence de chaque allèle (fréquence allélique) codé par le gène comportant le SNP dans la population d'individus est alors effectuée, ce qui permet de déterminer l'importance de leur impact et leur répartition dans les différents sous-groupes et notamment, le cas échéant, les diverses ethnies qui constituent cette population d'individus.

Les données de génotypage sont analysées pour estimer les fréquences de distributions des différents allèles observés dans les populations étudiées. Les calculs de fréquences alléliques peuvent être réalisés à l'aide de logiciels tels SAS-suite® (SAS) ou SPLUS® (MathSoft). La comparaison des distributions alléliques du polymorphisme de type SNP de l'invention au travers des différentes ethnies de la population d'individus peut être réalisée au moyen des logiciels ARLEQUIN® et SAS-suite®.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour la recherche d'une variation dans la séquence nucléotidique du gène EPO chez un individu.

#### Vecteur d'expression et cellule hôte

La présente invention a aussi pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins un polynucléotide conforme à l'invention.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés, comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les baculovirus, les papillonna virus comme SV40, les vaccinia virus, les adénovirus, les fox pox virus, les pseudorabies virus, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence nucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de l'homme du métier, telles que, par exemple, celles qui sont décrites dans

5 MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra) Sambrook et al..

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences nucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences nucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide de l'invention et la traduction d'un polypeptide  
10 de l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en œuvre.

Ainsi, par exemple, un signal de sécrétion approprié peut être intégré dans le vecteur recombinant pour que le polypeptide, codé par le polynucléotide de l'invention, soit dirigé vers la lumière du réticulum  
15 endoplasmique, vers l'espace périplasmique, sur la membrane ou vers l'environnement extracellulaire.

La présente invention a aussi pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant conforme à l'invention.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut  
20 être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que celles décrites dans BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986 et MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, telles que la transfection par calcium phosphate, la transfection par DEAE dextran, la  
25 transvection, la microinjection, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes telles que les cellules de streptocoque, de staphylocoque, d'*E. coli* ou de *Bacillus subtilis*, des cellules de champignons telles que les cellules de  
30 levure et les cellules d'*Aspergillus*, de *Streptomyces*, des cellules d'insectes telles que les cellules de *Drosophila* S2 et de *Spodoptera* Sf9, des cellules

animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 et des cellules humaines du sujet à traiter ou encore des cellules végétales.

Les cellules hôtes peuvent être utilisées, par exemple, pour exprimer un polypeptide de l'invention ou en tant que produit actif dans des compositions pharmaceutiques, comme on le verra ci-après.

### Polypeptide

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité, 10 préférentiellement au moins 90 % d'identité, plus préférentiellement au moins 95 % d'identité, et encore plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec:

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou avec
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 15 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
  - D70N,
  - G104S,
  - 20 - S147C.

Le polypeptide de l'invention peut également comprendre :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, 25 sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP définis précédemment.

Le polypeptide de l'invention peut tout particulièrement consister en :

- 30 a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,



sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP définis précédemment.

Préférentiellement, un polypeptide conforme à l'invention comporte

5 un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :

- D70N,
- G104S,
- S147C,

10 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide ci-dessus décrit, dans lequel une cellule hôte définie précédemment est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la précipitation à  
15 l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol l'acétone ou l'acide trichloroacétique, l'extraction à l'acide; la chromatographie échangeuse d'ions; la chromatographie par phosphocellulose; la chromatographie par interaction hydrophobe; la chromatographie d'affinité; la chromatographie hydroxylapatite ou les  
20 chromatographies d'exclusion.

On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la  
25 conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

### Anticorps

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention  
30 d'un anticorps immunospécifique.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi que les fragments

Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines.

Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide conforme à l'invention.

- 5 L'invention concerne aussi un anticorps immunospécifique pour un polypeptide conforme à l'invention, tel que défini précédemment.

Un polypeptide selon l'invention, un de ses fragments, un analogue, un de ses variants ou une cellule exprimant ce polypeptide peuvent aussi être utilisés pour produire des anticorps immunospécifiques.

- 10 Le terme "immunospécifique" signifie que l'anticorps possède une meilleure affinité pour le polypeptide de l'invention que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

- Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide de l'invention, d'un de ses fragments, d'un  
15 analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polynucléotide chez un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

- Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires,  
20 telles que la technique des hybridomes (Kohler et al., Nature (1975) 256 :495-497), la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4 :72) et la technique des hybridomes EBV (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985).

- 25 Les techniques de production d'anticorps simple-chaîne telles que décrites, par exemple, dans US N° 4,946, 778 peuvent être également utilisées.

Des animaux transgéniques comme les souris, par exemple, peuvent être également utilisés pour produire des anticorps humanisés.

Agents interagissant avec le polypeptide de l'invention

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 5 a) la mise en présence de cellules hôtes, telles que définies ci-dessus avec un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur, ou inhibiteur, généré par l'agent à tester.

Un polypeptide conforme à l'invention peut ainsi être employé pour un procédé de criblage de composés qui rentrent en interaction avec celui-

10 ci.

Ces composés peuvent être des agents activateurs (agonistes) ou inhibiteurs (antagonistes) de l'activité intrinsèque d'un polypeptide selon l'invention. Ces composés peuvent également être des ligands ou des substrats d'un polypeptide de l'invention. Voir Coligan et al., Current Protocols in  
15 Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991).

En général, pour mettre en place un tel procédé, il est d'abord souhaitable de produire des cellules hôtes appropriées qui expriment un polypeptide conforme à l'invention. De telles cellules peuvent être, par exemple, des cellules de mammifères, de levures, d'insectes comme *Drosophila* ou de  
20 bactéries comme *E. coli*.

Ces cellules ou des extraits de membrane de ces cellules, sont alors mises en présence des composés à tester.

On peut ainsi observer la capacité de liaison des composés à tester avec le polypeptide de l'invention, mais également l'inhibition ou  
25 l'activation de la réponse fonctionnelle.

L'étape b) du procédé ci-dessus peut être mise en œuvre en utilisant un agent à tester marqué directement ou indirectement. Elle peut aussi comprendre un test de compétition, en utilisant un agent marqué ou non et un agent compétiteur marqué.

30 On peut également déterminer si un agent à tester conduit à la génération d'un signal d'activation ou d'inhibition sur des cellules exprimant le

polypeptide de l'invention, en utilisant des moyens de détection appropriés, suivant le signal à détecter.

De tels agents activateurs ou inhibiteurs peuvent être des polynucléotides, et dans certains cas des oligonucléotides ou des polypeptides, 5 comme des protéines ou des anticorps, par exemple.

La présente invention a aussi pour objet une méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes obtenues comme décrit ci-dessus avec 10 un agent à tester, et
- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur, généré par ledit polypeptide sur l'agent à tester.

Un agent activé ou inhibé par le polypeptide de l'invention est un agent qui répond, respectivement, par une activation ou une inhibition en 15 présence de ce polypeptide. Les agents activés ou inhibés, directement ou indirectement, par le polypeptide de l'invention peuvent consister en des polypeptides comme, par exemple, des récepteurs membranaires ou nucléaires, des kinases et plus préférentiellement des tyrosines kinases, des facteurs de transcription ou des polynucléotides.

20

#### Détection de maladies

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 25 a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'invention dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'invention chez un sujet.

La détection d'un polynucléotide et d'un polypeptide de l'invention 30 peut ainsi permettre de savoir si un sujet est atteint ou risque d'être atteint ou, au contraire, présente une résistance partielle au développement d'une maladie, d'une indisposition ou d'un dérèglement tels que définis

précédemment, relatifs à l'expression et/ou l'activité d'un polypeptide de l'invention.

La concentration "normale" d'un polypeptide peut être prédéterminée par l'homme du métier par des tests ou des essais  
5 conventionnels qui lui permettront d'identifier le seuil au-dessus ou en dessous duquel apparaît la sensibilité ou, au contraire, la résistance à la maladie, l'indisposition ou le dérèglement évoqué ci-dessus.

Le polynucléotide à tester peut être obtenu à partir d'échantillons biologiques du sujet à étudier, tels que des cellules, du sang, de l'urine, de la  
10 salive, ou à partir d'une biopsie ou d'une autopsie du sujet à étudier. L'ADN génomique peut être utilisé directement pour la détection ou après à une amplification par PCR, par exemple. L'ARN ou l'ADNc peuvent également être utilisés de façon similaire.

Il est ensuite possible de comparer la séquence nucléotidique d'un  
15 polynucléotide conforme à l'invention avec la séquence nucléotidique détectée dans le génome du sujet.

La comparaison des séquences nucléotidiques peut être effectuée par séquençage par des méthodes d'hybridation de l'ADN, par différence de mobilité des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse avec ou sans agents  
20 dénaturants ou par différence de températures de fusion. Voir Myers et al., Science (1985) 230 :1242. De telles modifications dans la structure de la séquence nucléotidique en un point précis peuvent également être révélées par des essais de protection aux nucléases, telles que l'ARNase et la nucléase S1 ou encore par des agents chimiques de clivage. Voir Cotton et al., Proc. Nat.  
25 Acad. Sci. USA (1985) 85 :4397-4401. Des sondes oligonucléotidiques comprenant un fragment d'un polynucléotide de l'invention peuvent également être utilisées pour conduire le criblage.

De nombreuses méthodes bien connues de l'homme du métier peuvent être utilisées pour déterminer l'expression d'un polynucléotide de  
30 l'invention et pour identifier la variabilité génétique de ce polynucléotide. Voir Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un

polynucléotide conforme à l'invention pour effectuer un diagnostic génétique d'une maladie ou d'une résistance à une maladie liée à la présence, chez un ou plusieurs individus de la population humaine, de l'allèle mutant codé par le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention.

5                    Ces maladies peuvent être des dérèglements et/ou des maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne  
10                   sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la  
15                   cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

20                   De même, la présence, l'absence et/ou la concentration de polypeptide selon l'invention peuvent aider au diagnostic d'une maladie, une indisposition ou un dérèglement ou, au contraire, la résistance à une maladie, une indisposition ou un dérèglement chez un sujet en prélevant un échantillon dérivé de ce sujet.

25                   L'augmentation ou la diminution de l'expression du polypeptide peut être mesurée en quantifiant le niveau d'ARN codant pour ce polypeptide, suivant les méthodes bien connues de l'homme du métier, par exemple, par PCR, RT-PCR, protection à l'ARNase, Northern blot, et autres méthodes d'hybridation.

30                   Il est également possible de déterminer la concentration en polypeptides de l'invention présents dans un échantillon biologique du sujet par

des méthodes bien connues, par exemple, par radioimmunoessai, tests de liaisons compétitives, Western blot et tests ELISA.

### Médicaments et traitements des maladies

5                   La présente invention a pour objet un médicament renfermant, à titre de principe actif, un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les  
10 différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies  
15 infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies,  
20 l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

L'invention concerne également l'utilisation d'un polypeptide, d'un  
25 polynucléotide, d'un vecteur recombinant, d'une cellule hôte et/ou d'un anticorps tels que définis précédemment, pour la fabrication d'un médicament destiné :

- à la prévention ou au traitement de l'anémie, tout particulièrement chez les patients dialysés en insuffisance rénale, ainsi que l'anémie consécutive à des infections chroniques, des processus inflammatoires, des radiothérapies, et des  
30 chimiothérapies, et

- à augmenter la production de sang autologue, notamment chez les patients participants à un programme de prélèvement autologue différé afin d'éviter une utilisation de sang homologue.

Certains des composés permettant d'obtenir le polypeptide conforme à l'invention ainsi que les composés obtenus ou identifiés par ou à partir de ce polypeptide peuvent également être utilisés pour le traitement thérapeutique du corps humain, c'est-à-dire à titre de médicament.

5 C'est pourquoi la présente invention a aussi pour objet un médicament contenant, à titre de principe actif un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention.

10 L'invention concerne encore l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention, d'un vecteur recombinant défini précédemment, d'une cellule hôte définie précédemment, d'un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de  
15 différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système  
20 immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie  
25 en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

30 Le dosage d'un polypeptide et des autres composés de l'invention, utiles en tant que principe actif, dépend du choix du composé, du mode



d'administration, de la nature de la formulation, de la nature du sujet et du jugement du médecin.

Lorsqu'il est utilisé comme principe actif, un polypeptide conforme à l'invention est généralement administré à des doses comprises entre 1 et 300  
5 unités/kg du sujet.

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps  
10 défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans ces compositions pharmaceutiques, le principe actif est avantageusement présent à des doses physiologiquement efficaces.

15 Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les caramels, les suppositoires et de préférence les préparations injectables et les poudres pour  
20 injectables. Ces formes pharmaceutiques peuvent être préparées selon les méthodes usuelles.

Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le dextrose, le glycérol,  
25 l'éthanol, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Le ou les principes actifs conforme à l'invention peuvent être  
30 employés seul ou en combinaison avec d'autres composés, tels que des composés thérapeutiques tels d'autres cytokines comme l'interleukine ou les interférons, par exemple.

Les différentes formulations des compositions pharmaceutiques sont adaptées suivant le mode d'administration.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par les différentes voies d'administration connues de l'homme du métier.

- 5 L'invention a également pour objet une composition de diagnostic qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide
- 10 conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

Les excipients appropriés utilisés dans la composition de diagnostic sont généralement des tampons et des conservateurs.

La présente invention a également pour objet l'utilisation :

- 15 a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur défini précédemment et/ou
- b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'invention, et/ou
- c) d'un polynucléotide selon l'invention, et/ou
- 20 d) d'une cellule hôte du sujet à traiter, définie précédemment, pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

- Ainsi, pour traiter un sujet qui a besoin d'une augmentation de l'expression ou de l'activité d'un polypeptide de l'invention, plusieurs méthodes
- 25 sont possibles.

Il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide de l'invention et/ou d'un agent activateur et/ou activé tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

- 30 Il est également possible d'augmenter la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide selon l'invention. Par exemple, ce polynucléotide peut être inséré dans un

vecteur rétroviral d'expression. Un tel vecteur peut être isolé à partir de cellules ayant été infectées par un vecteur de plasmide rétroviral contenant de l'ARN codant pour le polypeptide de l'invention, de telle façon pour que les cellules transduites produisent des particules virales infectieuses contenant le gène d'intérêt. Voir Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

Il est également possible d'administrer au sujet des cellules hôtes lui appartenant, ces cellules hôtes ayant été prélevées et modifiées, au préalable, de façon à exprimer le polypeptide de l'invention, comme décrit précédemment.

La présente invention concerne également l'utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur défini précédemment, et/ou
  - 15 b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps immunospcifique défini précédemment, et/ou
  - c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide conforme à l'invention,
- pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité, chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

Ainsi, il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur et/ou d'un anticorps tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

25 Il est également possible de diminuer la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide complémentaire conforme à l'invention permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide de l'invention.

## 30 PARTIE EXPERIMENTALE

Exemple 1 : Modélisation d'une protéine codée par un polynucléotide de séquence nucléotidique comportant un polymorphisme de type SNP g1644a,

g2357a ou c2621g et de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence

Dans une première étape la structure tridimensionnelle de l'EPO a été construite à partir de celle disponible dans la base de données PDB (code 5 1EER) et ce en utilisant le logiciel Modeler (MSI, San Diego, CA).

Le fragment polypeptidique mature a ensuite été modifié de façon à reproduire la mutation D70N, G104S ou S147C.

Un millier d'étapes de minimisations moléculaires ont été conduites sur ce fragment muté en utilisant les programmes AMBER et 10 DISCOVER (MSI : Molecular Simulations Inc.).

Deux suites de calculs de dynamiques moléculaires ont ensuite été effectuées avec le même programme et les mêmes champs de forces.

Dans chaque cas, 50000 étapes ont été calculées à 300°K, terminées par 300 étapes d'équilibration.

15 Le résultat de cette modélisation est visualisé sur les Figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6.

#### Exemple 2 : Génotypage des polymorphismes de type SNP c2621g dans une population d'individus

20 Le génotypage de SNPs est basé sur le principe du miniséquençage dont le produit est détecté par une lecture de fluorescence polarisée. La technique consiste en un miniséquençage fluorescent (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-terminator Incorporation).

25 Le miniséquençage consiste à allonger un oligonucléotide amorce, placé juste en amont du site polymorphe, par des didéoxynucléotides fluoromarkés à l'aide d'une enzyme polymérase. Le résultat de cet allongement est directement analysé par une lecture de fluorescence polarisée.

#### 30 A) Protocole

Le miniséquençage est réalisé sur un produit obtenu après amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de chaque individu de la

population d'individus d'un fragment de séquence nucléotidique de l'EPO.

Ce produit PCR est choisi pour couvrir la région génique contenant le polymorphisme de type SNP de l'invention. Ensuite, on élimine les amorces de PCR et les dNTPs non incorporés avant de réaliser le miniséquençage. Toutes ces étapes, ainsi que la lecture, sont réalisées dans la même plaque.

Le génotypage requiert donc 5 étapes :

- 1) Amplification par PCR
- 2) Purification du produit de PCR par digestion enzymatique
- 10 3) Elongation de l'oligonucléotide amorce
- 4) Lecture
- 5) Interprétation de la lecture

#### Etape 1)

15 L'amplification PCR de la séquence nucléotidique du gène EPO qui couvre la région génique contenant le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention est effectuée pour chaque individu de la population d'individus.

La population d'individus est composée d'ADNs génomiques fournis par l'Institut Coriell aux Etats-Unis.

20 Les 249 individus se répartissent comme suit :

POPULATION	DESCRIPTION	NOMBRE D'INDIVIDUS
1	Afro Américain	50
2	Amérindien du Sud Ouest	5
3	Sud Américain (Andes)	10
4	Caribéen	10
5	Caucasien	60
6	Chinois	10
7	Grec	8
8	Ibérien	10
9	Italien	10
10	Japonais	10
11	Mexicain	10
12	Moyen-Orient	20
13	Individus du Pacifique	7
14	Indo-Pakistanaï	9
15	Sud Américain	10
16	Asie du Sud	10

L'amplification PCR est réalisée à partir d'amorces que l'homme du métier peut facilement déterminer à l'aide de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

5 Les amorces sont les suivantes : ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

Ces séquences nucléotidiques permettent d'amplifier un fragment d'une longueur de 626 nucléotides, du nucléotide 2192 au nucléotide 2817 dans la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1.

10 Les amplifiats PCR serviront de matrice pour la réaction de miniséquençage.

Le volume réactionnel est de 5 µl par échantillon comme décrit dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube ( µl)	Conc. finale
Life Technologie	Livré avec Taq	Tampon (X)	10	0,5	1
Life Technologie	Livré avec Taq	MgSO <sub>4</sub> (mM)	50	0,2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0,1	0,2
	Sur demande	Amorce F ( µM) ID SEQ N° 3	10	0,1	0,2
	Sur demande	AmorceR (µM) ID SEQ N° 4	10	0,1	0,2
Life Technologie	11304-029	Taq platinum	5U/ µl	0,02	0,1 U/ réaction
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 µl	1,98	
		ADN	2,5 ng/ µl	2	5 ng/ réaction
		Volume total		5 µl	

Ces réactifs sont distribués dans une plaque PCR noire à 384 puits fournie par ABGene (ref :TF-0384-k). Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles de PCR : 1 min à 94° C, suivi de 36 cycles composés de 3 étapes (15 sec. à 94° C, 30 sec. à 56° C, 1 min. à 68° C).

#### Etape 2)

- 10 La PCR est ensuite purifiée à l'aide de deux enzymes que sont la phosphatase alcaline de crevette (ou Shrimp Alkaline Phosphatase SAP) et l'exonucléase I (Exo I). La première de ces enzymes permet la déphosphorylation des dNTPs non incorporés au cours de la PCR, tandis que
- 15 utilisées au cours de la PCR. Cette digestion se fait par addition dans la plaque de PCR d'un mélange réactionnel de 5 µl par échantillon préparé comme décrit dans le tableau suivant :

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube ( µl)	Conc. finale
AP Biotech	E70092X	SAP	1 U/ µl	0,5	0,5/ réaction
AP Biotech	070073Z	Exo I	10 U/ µl	0,1	1/ réaction
AP Biotech	Fourni avec SAP	Tampon SAP (X)	10	0,5	1
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 µl	3,9	
		PCR		5 µl	
		Vol total		10 µl	

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Digestion SAP-EXO : 45 min à 37° C, 15min à 80° C.

5

### Etape 3)

L'étape d'élongation ou de miniséquençage est ensuite réalisée sur ce produit de PCR digéré, par addition d'un mélange réactionnel de 5 µL par échantillon préparé, comme indiqué dans le tableau suivant :

10

Fournisseur	Référence	Réactif	Conc. initiale	Vol. par tube ( µl)	Conc. finale
Propre préparation		Tampon Elongation <sup>1</sup> (X)	5	1	1
Life Technologies	Sur demande	Amorce Miniseq ( µM) A ou B	10	0,5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs <sup>2</sup> ( µM) 2 non marqués	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
NEN	Nel 472/5 et Nel 492/5	ddNTPs <sup>2</sup> ( µM) 2 marqués Tamra et R110	2,5 de chaque	0,25	0,125 de chaque
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3,2 U/ µl	0,125	0,4 U/ réaction
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 µl	3,125	
		PCR digérée		10 µl	
		Vol total		15 µl	



- <sup>1</sup> Le tampon élongation : Le tampon élongation 5X est composé de Tris-HCl pH 9 à 250 mM, de KCl à 250 mM, de NaCl à 25 mM, de MgCl<sub>2</sub> à 10 mM et de glycérol à 40 %.
- <sup>2</sup> ddNTPs : Pour les ddNTPs, un mélange des 4 bases est réalisé en fonction du polymorphisme étudié. Seulement les 2 bases d'intérêts (C/G) composant le polymorphisme de type SNP fonctionnel portent un marquage, soit en Tamra, soit en R110. Le mélange de ddNTPs est composé de :
- 2,5 µM de ddATP non marqué,
  - 2,5 µM de ddTTP non marqué,
  - 2,5 µM de ddGTP (1,875 µM de ddGTP non marqué et 0,625 µM de ddGTP marqué au Tamra),
  - 2,5 µM de ddCTP (1,875 µM de ddCTP non marqué et 0,625 µM de ddCTP marqué au R110).

Une fois remplie, la plaque est scellée, centrifugée puis placée dans un thermocycleur pour plaque 384 puits (Tetrad de MJ Research) et subit l'incubation suivante : Cycles d'élongation : 1 min. à 93° C, suivi de 35 cycles composés de 2 étapes (10 sec. à 93° C, 30 sec. à 55° C).

Après la dernière étape dans le thermocycleur, la plaque est directement placée sur un lecteur de fluorescence polarisée de type Analyst® HT de LJJL Biosystems Inc.. La plaque est lue à l'aide du logiciel Criterion Host® en utilisant deux méthodes. La première permet de lire la base marquée en Tamra en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 550-10 nm, émission 580-10 nm) et la seconde permet de lire la base marquée en R110 en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifiques de ce fluorophore (excitation 490-10 nm, émission 520-10 nm). Dans les deux cas, un miroir double dichroïque (R110/Tamra) est utilisé et les autres paramètres de lecture sont :

Z-height : 1,5 mm

Attenuator : out

Temps d'intégration : 100,000 µsec.

Raw data units : counts/sec

Switch polarization : by well

Plate settling time : 0 msec

PMT setup : Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer : emission

Static polarizer : S

Un fichier résultat est alors obtenu contenant les valeurs calculées de mP pour le filtre Tamra et celle pour le filtre R110. Ces valeurs de mP sont calculées à partir des valeurs d'intensité obtenues sur le plan parallèle(//) et sur le plan perpendiculaire (⊥) d'après la formule suivante :

$$5 \quad mP = 1000(// - g\perp)/(// + g\perp).$$

Dans ce calcul, la valeur sur le filtre ⊥ est pondérée d'un facteur g. Celui-ci est un paramètre machine qui doit être déterminé préalablement expérimentalement.

#### 10 Etape 4) et 5)

Interprétation de la lecture et détermination des génotypes.

Les valeurs de mP sont reportées sur un graphe à l'aide du logiciel Excel de Microsoft Inc., et/ou du logiciel Allele Caller® développé par LJI Biosystems Inc..

15 En abscisse est indiquée la valeur de mP de la base marquée au Tamra, en ordonnée est indiquée la valeur de mP de la base marquée au R110. Une forte valeur de mP indique que la base marquée avec ce fluorophore est incorporée et, inversement, une faible valeur de mP révèle l'absence d'incorporation de cette base.

20 On obtient jusqu'à 3 groupes homogènes de séquences nucléotidiques ayant des génotypes différents, comme indiqué dans la Figure 7.

L'utilisation du logiciel Allele Caller® permet, une fois le repérage des différents groupes réalisé, d'extraire directement le génotype défini pour chaque individu sous forme d'un tableau.

25 Les séquences des deux amorces de miniséquençage nécessaires pour le génotypage ont été déterminées. Ces amorces sont sélectionnées pour correspondre à une vingtaine voire une trentaine de nucléotides placés juste en amont du site polymorphe. Du fait que le produit de PCR contenant un SNP est un produit d'ADN double brin, le génotypage peut  
30 donc se faire soit sur le brin sens soit sur le brin antisens. Les amorces sélectionnées sont fabriquées par Life Technologies Inc.

Les amorces du miniséquençage sont les suivantes :

Amorce sens : (A) : ttggcagaaggaagccatct

Amorce antisens : (B) : ctgaggccgcatctggaggg

Le miniséquençage du polymorphisme de type SNP c2621g a d'abord été validé sur 16 échantillons, puis génotypé sur l'ensemble de la population d'individus composée de 249 individus et 10 blancs.

Conditions de miniséquençage testées :

Condition N° 1 :

Amorce sens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

Condition N° 2 :

Amorce sens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

Condition N° 3 :

Amorce antisens + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

Condition N° 4 :

Amorce antisens + ddCTP-R110 + ddGTP-Tamra

Ces 4 conditions ont été testées et la condition N° 1 a été retenue pour le génotypage.

## B) Résultats

Après la réalisation complète du processus de génotypage, la détermination des génotypes des individus de la population d'individus pour la SNP fonctionnel étudié ici a été réalisée à l'aide du graphe représenté sur la Figure 7.

Ce génotype est en théorie soit homozygote CC, soit hétérozygote CG, soit homozygote GG chez les individus testés. En réalité et comme montré ci-dessous, le génotype homozygote GG n'est pas détecté dans la population d'individus.

Les résultats des contrôles, de la répartition des génotypes déterminés dans la population d'individus et le calcul des différentes fréquences alléliques pour ce polymorphisme de type SNP fonctionnel sont présentés dans les tableaux suivants :

Nombre d'individus		Nombre de blanc		Pourcentage de réussite
testés	génotypés	testés	validés	
249	236	10	10	95,0

POPULATION	N	%	Fréquence allélique			Génotype GG		Génotype GC		Génotype CC	
			%	95% IC							
Afro Américain	50	20,1	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	50	100,0
Amérindien du Sud Ouest	5	2,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	5	100,0
Sud Américain (Andes)	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Caribéen	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Caucasien	60	24,1	0,9	0,0	2,5	0	0,0	1	1,7	57	98,3
Chinois	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Grec	8	3,2	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	6	100,0
Ibérien	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Italien	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	10	100,0
Japonais	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Mexicain	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Moyen-Orient	20	8,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	18	100,0
Individus du Pacifique	7	2,8	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	7	100,0
Indo-Pakistanaïs	9	3,6	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Sud Américain	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	8	100,0
Asie du Sud	10	4,0	0,0	-	-	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Total	249	100	0,2	0,0	0,6	0	0,0	1	0,4	235	99,6

Dans le tableau ci-dessus,

- N représente le nombre d'individus,
  - % représente le pourcentage d'individus dans la sous-population spécifique,
  - la fréquence allélique représente le pourcentage de l'allèle muté dans la sous-population spécifique,
- 5
- 95 % IC représente l'intervalle minimal et maximal de confiance à 95 %.

En examinant ces résultats par population, on constate que le seul individu hétérozygote CG est issu de la sous-population caucasienne de la population d'individus.

REVENDECATIONS

## 1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, sous réserve que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- g1644a,
  - g2357a,
  - 10 - c2621g, ou
- b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

## 2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante sous réserve que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- g1644a,
  - g2357a,
  - c2621g, ou
- 20 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

3. Polynucléotide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, sous réserve que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- 25
- g1644a,
  - g2357a,
  - c2621g.

4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique a) comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par :
- 30
- g1644a,

- g2357a, et
- c2621g.

5. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant :

- 5 a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou
- b) la séquence d'acides aminés comprenant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 10 - D70N,
- G104S,
- S147C.

6. Polynucléotide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comportant un seul polymorphisme de type SNP choisi

- 15 dans le groupe constitué par :

- D70N,
- G104S, et
- S147C.

7. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'ADN ou d'ARN.

8. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, sous réserve que chacune de ces

- 25 séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants:

- g1644a,
- g2357a,
- c2621g.

9. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comme outil de génotypage.

10. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à



7, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

11. Procédé de détermination selon la revendication 10, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

5 12. Procédé de détermination selon la revendication 11, dans lequel le miniséquençage est réalisé avec les amorces sens et antisens correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 3 et ID SEQ N° 4.

10 13. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène EPO chez un individu.

14. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

15 15. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 14.

16. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 15 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

20 17. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 80 % d'identité avec

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 ou avec

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,

sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)

25 comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- D70N,

- G104S,

- S147C.

30 18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 5    - D70N,  
     - G104S,  
     - S147C.

19. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisé en ce qu'il consiste en

- 10    a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, ou  
     b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 28 et 193 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, sous réserve que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- 15    - D70N,  
     - G104S,  
     - S147C.

20. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte un seul polymorphisme de type SNP choisi dans le groupe constitué par:

- D70N,  
     - G104S, et  
     - S147C.

- 25                    21. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospécifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

                     22. Anticorps immunospécifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

- 30                    23. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

     a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent

à tester, et

- b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

24. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :

- 5 a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent à tester, et  
b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

25. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un  
10 polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, comprenant :  
a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans le génome du sujet, et/ou  
b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration  
prédéterminée d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17  
15 à 20, dans un échantillon biologique du sujet.

26. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

27. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné à la  
20 prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les myélomes, les tumeurs, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les  
25 maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples,  
30 l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements

par chimiothérapie.

28. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, pour la préparation d'un médicament destiné :

- à la prévention ou au traitement de l'anémie, tout
- 5 particulièrement chez les patients dialysés en insuffisance rénale, ainsi que l'anémie consécutive à des infections chroniques, des processus inflammatoires, des radiothérapies, et des chimiothérapies, et
- à augmenter la production de sang autologue, notamment chez les patients participants à un programme de prélèvement autologue différé afin
- 10 d'éviter une utilisation de sang homologue.

29. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22.

- 15 30. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les
- 20 différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les myélomes, les tumeurs, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le
- 25 SIDA, les pneumonies, les colites ulcératives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns,
- 30 les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

31. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné :

- 5                   - à la prévention ou au traitement de l'anémie, tout particulièrement chez les patients dialysés en insuffisance rénale, ainsi que l'anémie consécutive à des infections chroniques, des processus inflammatoires, des radiothérapies, et des chimiothérapies, et
- à augmenter la production de sang autologue, notamment chez
- 10 les patients participants à un programme de prélèvement autologue différé afin d'éviter une utilisation de sang homologue.

32. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un

15 vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

33. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, un

20 polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 22, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

34. Utilisation :

- 25 a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, et/ou
- b) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et/ou
- c) d'une cellule hôte selon la revendication 15, cette cellule provenant du sujet à traiter,
- 30 pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

## 35. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la revendication 21, et/ou
- b) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon  
5 l'une quelconque des revendications 1 à 7,  
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité chez  
un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20.

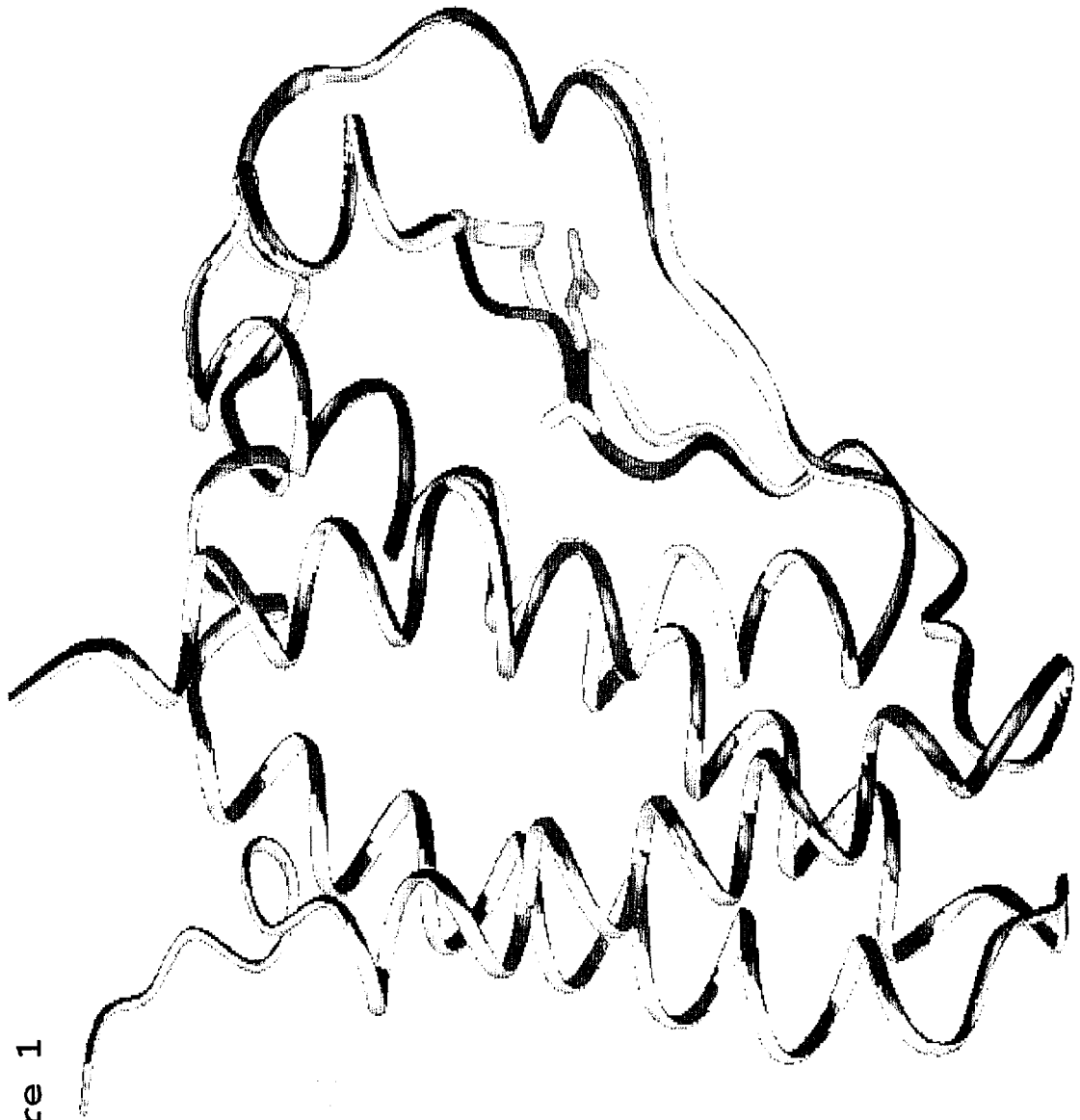


Figure 1



Figure 2



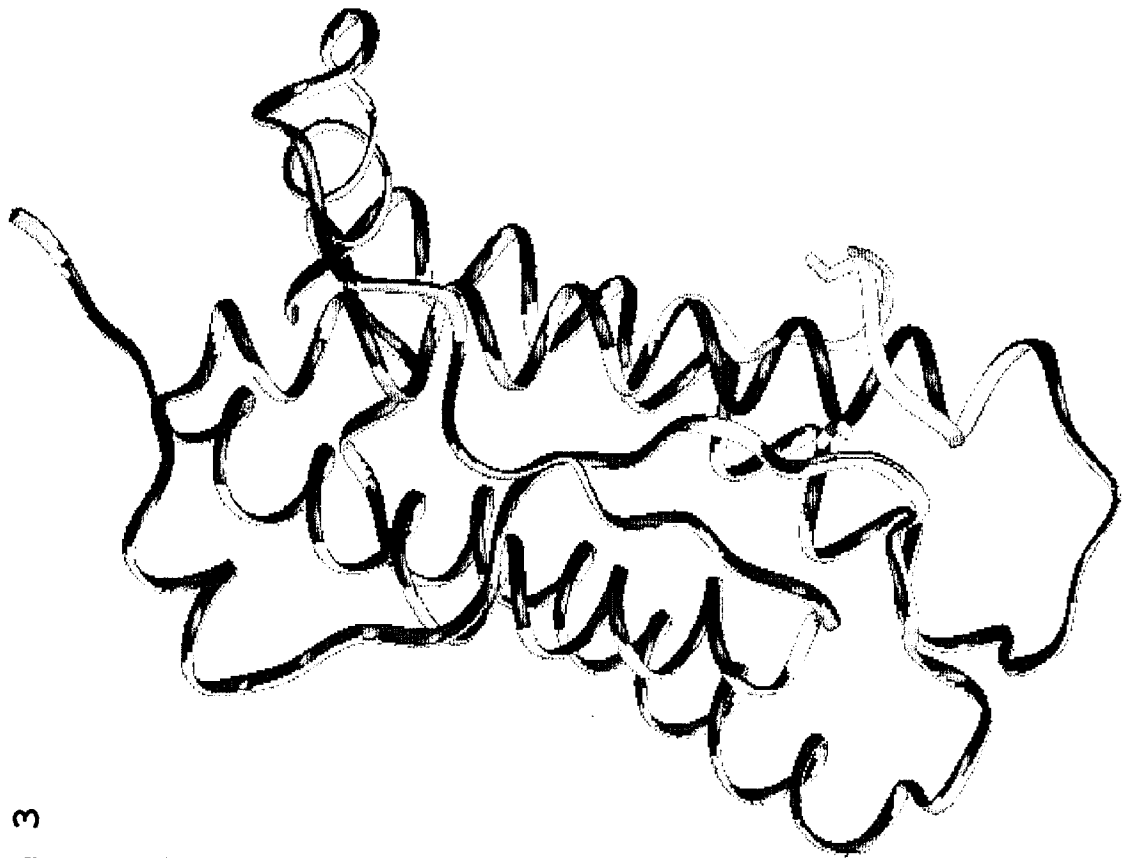


Figure 3

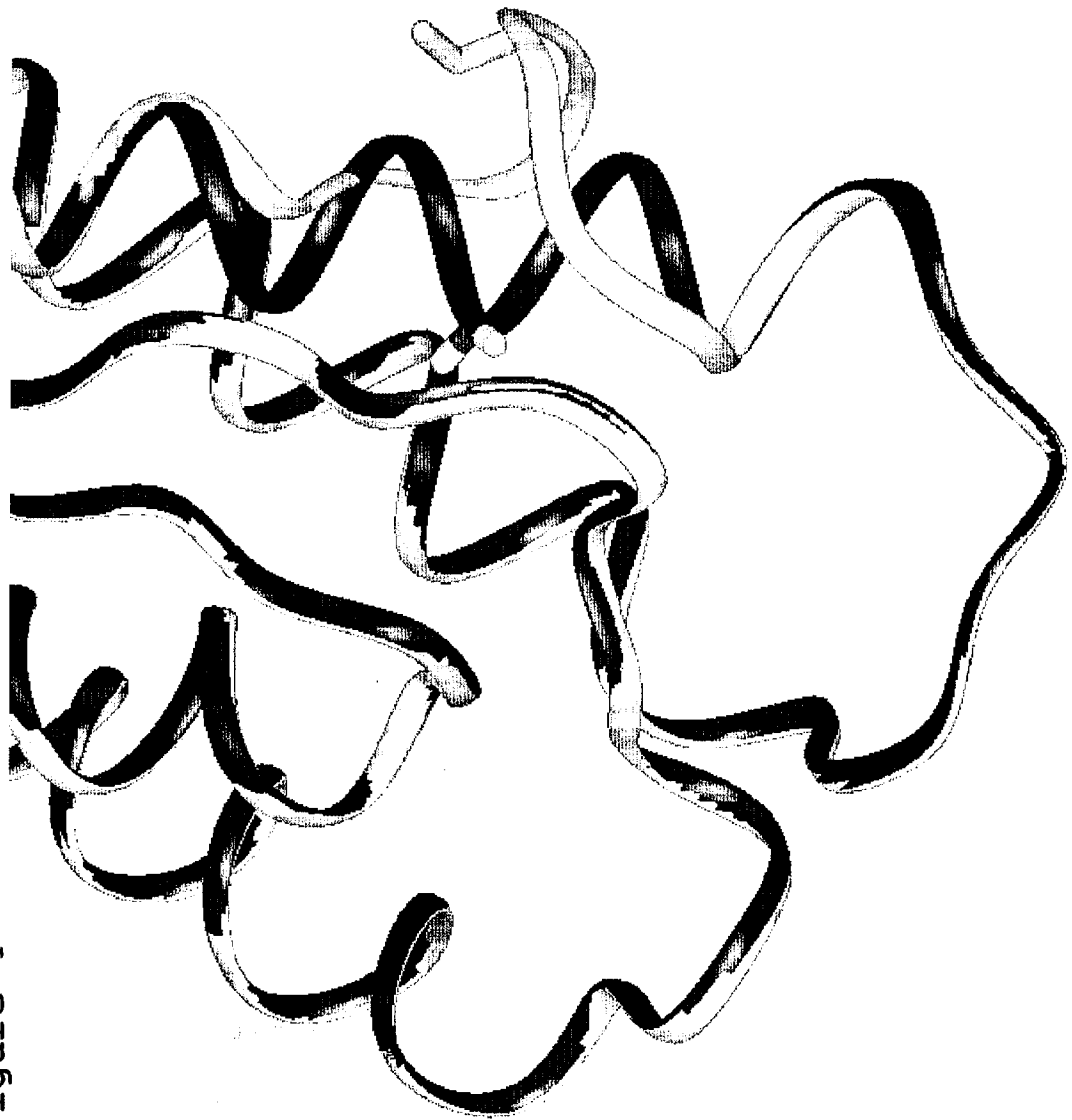


Figure 4

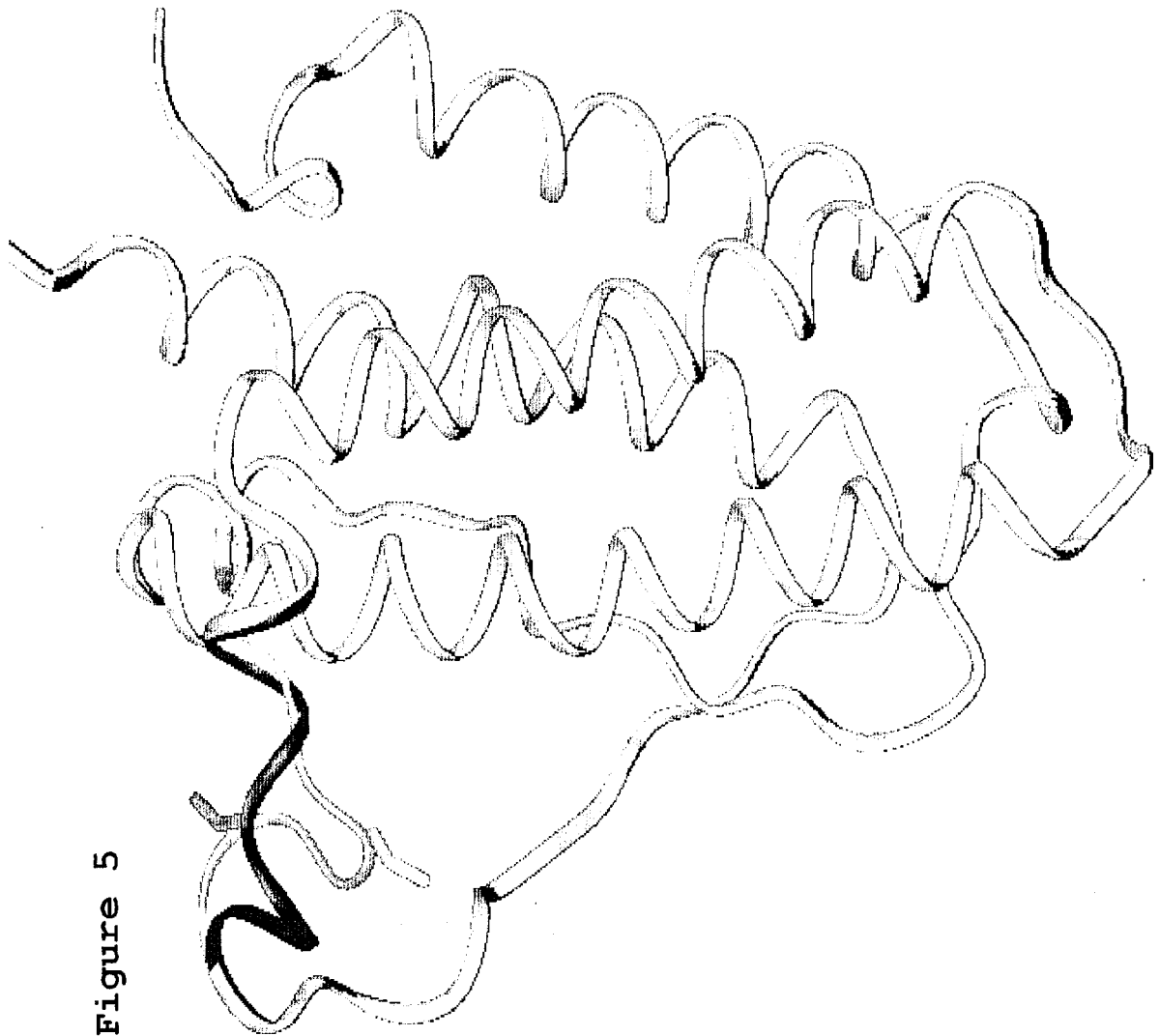


Figure 5

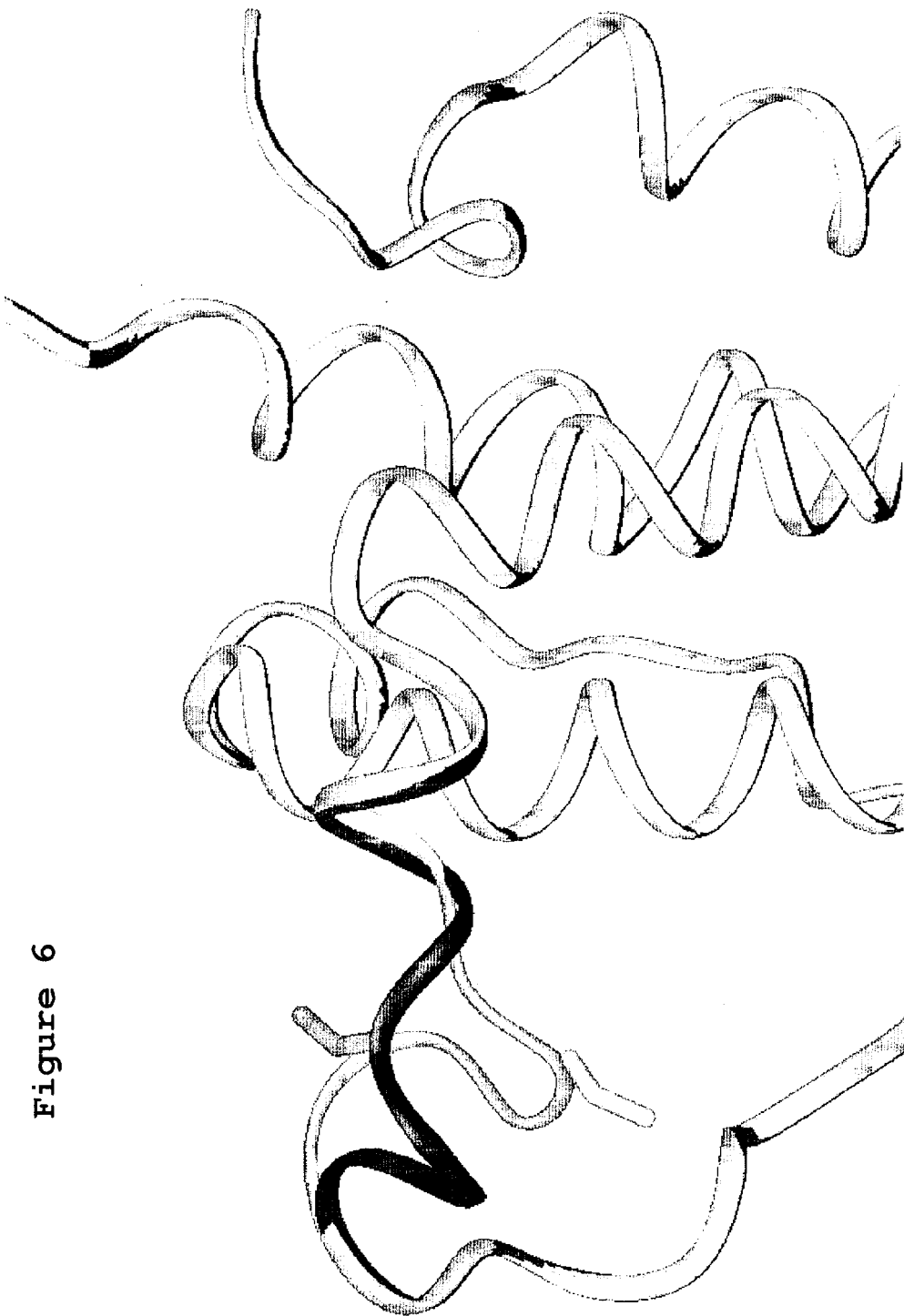
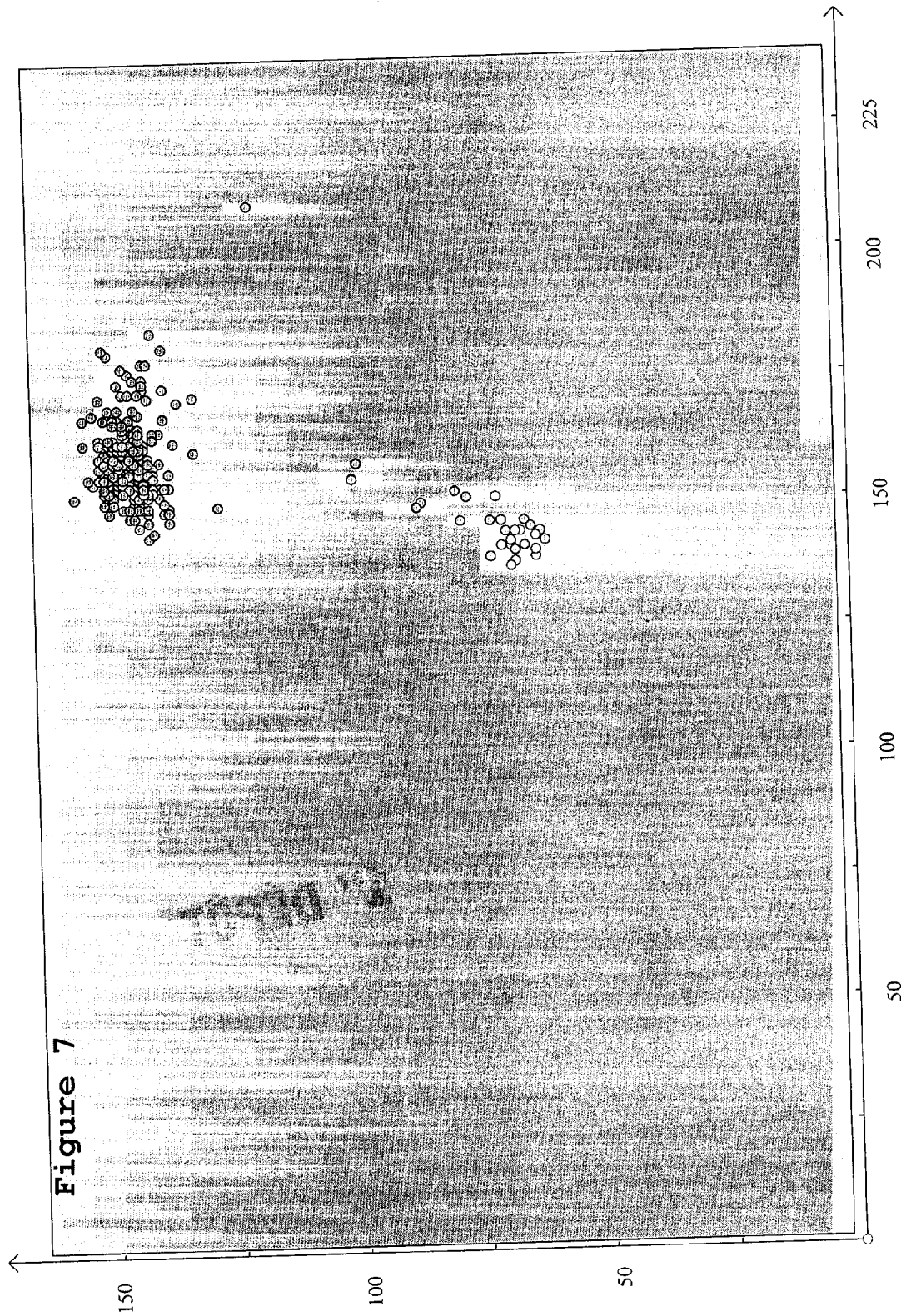


Figure 6



LISTE DE SEQUENCES

5 <110> GENODYSSEE  
 <120> Nouveaux polynucléotides comportant des polymorphismes  
 de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique  
 du gène érythropoïétine (EPO) ainsi que de nouveaux  
 10 polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs  
 utilisations thérapeutiques.  
 <130> EPO  
 <140>  
 15 <141>  
 <160> 4  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 20 <210> 1  
 <211> 3398  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 1  
 agcttctgagg cttccagacc cagctacttt gcggaactca gcaaccagg catctctgag 60  
 tctccgcca agaccgggat gccccccagg aggtgtccgg gagccagcc tttccagat 120  
 agcagctccg ccagtcacca ggggtgcgcaa ccggtgcac tcccccccg cgaaccagg 180  
 30 cccgggagca gcccccatga cccacacgca cgtctgcagc agccccgtca gccccggagc 240  
 ctcaacccag gcgtcctgcc cctgctctga cccgggtgg cccctacccc tggcgacccc 300  
 tcacgcacac agcctctccc ccacccccac ccgcgcacgc acacatgcag ataacagccc 360  
 cgacccccgg ccagagccgc agagtccctg ggccaccccg gccgctcgt gcgctgcgc 420  
 gcacgcgcgt gtctcccccg agccggaccg ggccacccgc gccgctctg ctccgacacc 480  
 35 gcgccccctg gacagccgcc ctctctcca ggcgcgtggg gctggccctg caccgccag 540  
 cttcccgga tgagggccc cgggtgtggtc acccgccgc ccaggtcgt gagggacccc 600  
 ggccaggcgc ggagatgggg gtgcacggtg agtactcgc ggctgggcgc tcccgccgc 660  
 ccgggtccct gtttgagcgg ggatttagcg ccccggtat tggccaggag gtggctgggt 720  
 tcaaggaccg gcgactgtc aaggacccc gaagggggag gggggtggg cagcctccac 780  
 40 gtgccagcgg ggaactgggg gactccttgg ggatggcaaa aacctgacct gtgaagggga 840  
 cacagtttgg gggttgagg gaagaaggtt tggggggttc tgcgtgcca gtggagagga 900  
 agctgataag ctgataacct gggcgtgga gccaccactt atctgccaga ggggaagcct 960  
 ctgtcacacc aggattgaag tttggccgga gaagtggatg ctggtagcct gggggtggg 1020  
 45 tgtgcacacg gcagcaggat tgaatgaagg ccaggaggc agcacctgag tgcttgcag 1080  
 gttggggaca ggaaggacga gctggggcag agacgtggg atgaaggaa ctgtccttcc 1140  
 acagccaccc ttctccctcc ccgctgaact ctacgctgg ctatctgttc tagaatgtcc 1200  
 tgcttggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct ctgggctcc cagtcctggg 1260  
 cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtctgcag aggtacctct tggaggccaa 1320  
 50 ggaggccgag aatatcaagg tgagaccct tccccagcac attccacaga actcacgctc 1380  
 agggcttcag ggaactcctc ccagatccag gaacctggca cttggtttgg ggtggagttg 1440  
 ggaagctaga cactgcccc ctacataaga ataagtctgg tggcccaaaa ccatacctgg 1500  
 aaactaggca aggagcaaag ccagcagatc ctacgctgt ggccagggcc agagccttca 1560  
 ggacccttg actccccgg ctgtgtgcat ttcagacggg ctgtgctgaa cactgcagct 1620  
 55 tgaatgagaa tatcactgtc ccagacacca aagttaatt ctatgcctgg aagaggtagg 1680  
 aggtgagttc ctttttttt ttttttctt tcttttggag aatctcatt gcgagcctga 1740  
 ttttgatga aagggagaat gatcgaggga aaggtaaaat ggagcagcag agatgaggct 1800  
 gcctgggcgc agaggctcac gtctataatc ccaggctgag atggccgaga tgggagaatt 1860  
 gcttgagccc tggagtttca gaccaaccta ggcagcatag tgagatcccc catctctaca 1920  
 aacatttaaa aaaattagtc aggtgaagtg gtgcatggtg gtagtcccag atatttggaa 1980

5 ggctgagggcg ggaggatcgc ttgagcccag gaatttgagg ctgcagtgag ctgtgatcac 2040  
 accactgcac tccagcctca gtgacagagt gaggccctgt ctcaaaaaag aaaagaaaaa 2100  
 agaaaaataa tgagggctgt atggaatacg ttcattattc attcactcac tcactcactc 2160  
 attcattcat tcattcattc aacaagtctt attgcatacc ttctgtttgc tcagcttggt 2220  
 gcttggggct gctgaggggc aggagggaga ggggtgacatc cctcagctga ctcccagagt 2280  
 ccactccctg taggtcgggc agcaggccgt agaagtctgg cagggcctgg cctgtctgtc 2340  
 ggaagctgtc ctgcggggcc aggcctgtt ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct 2400  
 gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ccttcgcagc ctcaaccactc tgcttcgggc 2460  
 tctggggagcc caggtgagta ggagcggaca cttctgcttg ccctttctgt aagaagggga 2520  
 10 gaagggctct gctaaggagt acaggaactg tccgtattcc ttccctttct gtggcactgc 2580  
 agcgacctcc tgttttctcc ttggcagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca 2640  
 gctgtctccac tccgaacaat cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc 2700  
 aatttctctc ggggaaagct gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga 2760  
 tgaccaggtg tgtccacctg ggcatatcca ccacctccct caccaacatt gcttgtgcc 2820  
 15 caccctcccc cgccactcct gaaccccgct gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc 2880  
 ccatggacac tccagtgcc ccaatgacat ctgaggggcc agaggaactg tccagagagc 2940  
 aactctgaga tctaaggatg tcacagggcc aacttgaggg ccagagcag gaagcattca 3000  
 gagagcagct ttaaactcag ggacagaccc atgctgggaa gacgcctgag ctactcggc 3060  
 accctgcaaa attgatgcca ggacacgctt tggaggcgat ttacctgtt tcgcacctac 3120  
 20 catcaggggac aggatgacct ggagaactta ggtggcaagc tgtgacttct ccaggtctca 3180  
 cgggcatggg cactoccttg gtggcaagag ccccttgac accgggggtg tgggaacct 3240  
 gaagacagga tgggggctgg cctctggctc tcatggggtc caacttttgt gtattcttca 3300  
 acctcattga caagaactga aaccaccaat atgactcttg gcttttctgt tttctgggaa 3360  
 25 cctccaaatc ccttggtctc gtccactcc tggcagca 3398

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 193

&lt;212&gt; PRT

30 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 35 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
 20 25 30  
 40 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
 50 55 60  
 45 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
 85 90 95  
 50 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
 100 105 110  
 55 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
 115 120 125  
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
 145 150 155 160  
 5 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
 165 170 175  
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
 180 185 190  
 10 Arg  
  
 15 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 3  
 ttgcatacct tctgtttgct 20  
  
 25 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <400> 4  
 cacaagcaat gttggtgag 19





2823220

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 605794  
FR 0104603

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 99 38890 A (GRODBERG JENNIFER ;BETH ISRAEL HOSPITAL (US); SYTKOWSKI ARTHUR J (US) 5 août 1999 (1999-08-05) * regarde spécialement les revendications (surtout 14 et 17) et figure 10c * * le document en entier *	1-13, 17-20, 23-35	C12N15/12 C12Q1/68 C12N15/63 C12P21/02 C12P21/08 C07K14/505 C07K16/22 G01N33/68 A61K38/18 A61K48/00 A61K39/395 A61P7/00 A61P9/00 A61P19/00 A61P35/00
Y	SYVANEN A-CH ET AL: "IDENTIFICATION OF INDIVIDUALS BY ANALYSIS OF BIALLELIC DNA MARKERS, USING PCR AND SOLID-PHASE MINISEQUENCING" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO,, US, vol. 52, no. 1, 1993, pages 46-59, XP002050638 ISSN: 0002-9297 * le document en entier *	1-13, 17-20, 23-35	
Y	YAMADA R ET AL: "IDENTIFICATION OF 142 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN 41 CANDIDATE GENES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE JAPANESE POPULATION" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 106, 2000, pages 293-297, XP002947356 * le document en entier *	9,10,27, 30	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  C12Q C12N C07K G01N A61K A61P
P,X	VILALTA A ET AL.: "Rabbit EPO gene and cDNA: Expression of rabbit EPO after inramuscular injection of pDNA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 284, juin 2001 (2001-06), pages 823-827, XP002188195 * regarde spécialement figure 1B, séquence 'Rabbit', résidu amino numéro 105 * * le document en entier *	17-20	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 janvier 2002		Knehr, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

1

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**  
**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0104603 FA 605794**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 24-01-2002  
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9938890 A	05-08-1999	US 6153407 A	28-11-2000
		AU 2576699 A	16-08-1999
		WO 9938890 A1	05-08-1999
<hr/>			